Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. F. Haffner

# Zur Frage der Verdaubarkeit von Zellen durch Trypsin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
**Eberhard Knauer**
aus Maisenbach OA. Neuenbürg

**1939**

Buchdruckerei Bölzle, Tübingen, Marktgasse 10

Dekan: Professor Dr. Usadel

Berichterstatter: Professor Dr. F. Haffner

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Universität Tübingen

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

# Zur Frage der Verdaubarkeit von Zellen durch Trypsin.

## Einleitung.

Die Unangreifbarkeit der gesunden Schleimhaut des Darmkanals durch Trypsin einerseits, die weitgehende Zerstörung des Gewebes bei Pankreasfettgewebsnekrose andererseits zeigt, daß den Epithelzellen des Darmes eine weitgehende Schutzmöglichkeit gegenüber der Verdauungskraft des Trypsins zukommt, die dem Gewebe zu fehlen scheint. Diese Verdaubarkeit des Gewebes durch die Fermente des Pankreas läßt sich im Tierexperiment einfach auf folgende Weise zeigen: Spritzt man einer weißen Maus z. B. 1% Trypsin-Lösung subkutan, so zeigt sich nach 24 Stunden an der Injektionsstelle ein starker Haarausfall und nach 48 Stunden hat sich ein großes Geschwür gebildet.

Es erschien deshalb interessant, die Frage zu untersuchen, inwieweit Zellen außerhalb des Körpers durch Trypsin angreifbar sind.

Auf Anregung von Herrn Prof. Haffner wurden in folgendem Versuche in dieser Richtung unternommen.

## Methodik.

Zu den Versuchen wurde als Verdauungsferment Trypsin Merck benützt. Für die Verdauungsversuche an Eiweißlösungen wurde es in Aqu. dest., an Zellen und Organen in isotonischer Kochsalzlösung gelöst. Die verwendete Trypsinkonzentration betrug zumeist 1%. Bei kurzfristigen Versuchen wurde mit höheren Konzentrationen gearbeitet.

Zur Einstellung der Reaktion diente anfangs sekundäres Natriumphosphat. Bei der Mehrzahl der Versuche verwendeten wir jedoch einen Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer pH 8.3 in einer Konzentration von mol/40. Unsere Trypsinlösungen selbst(10%ig, 5%ig, 2.5%ig und 1%ig) hatten ein pH zwischen 6 und 7.

Die Verdauung erfolgte bei 38° C im Brutschrank. Der Verdauungseffekt wurde je nach dem Substrat in verschiedenen zeitlichen Abständen festgestellt. Da in sehr vielen Fällen nach 6 Stunden sich schon Fäulniserscheinungen zeigten, nahmen wir die Ablesung im allgemeinen innerhalb der ersten 4 Stunden vor. Bei längerfristigen Versuchen dienten als Konservierungsmittel Toluol oder kleine Thymolkristalle.

## I. Vorversuche über die Trypsinwirkung auf Eiweißlösungen.

Als Testsubstrat stellten wir eine Eiweißlösung auf folgende Weise her: Blutserum oder haemolysiertes Blut wurde mit einer Recordspritze durch eine feine Kanüle in kochendes Wasser eingespritzt. Dabei entsteht eine gleichmäßige, undurchsichtige, stabile, kolloidale Lösung, die bei haemolysiertem Blut eine schokoladebraune Farbe zeigt. Da diese Haemoglobin-Lösung von ziemlich dunkler Farbe war, wurde sie bei den Versuchen in einer Endkonzentration von 1% des Ausgangsblutes angesetzt, während Serum stets 10%ig verwendet wurde.

Die Trübung hellte sich zwar bei starker Alkaleszenz auf, war aber bei dem von uns verwendeten pH noch sehr intensiv. Unter Trypsineinwirkung. trat ein Klarwerden der Lösung auf. Diese Aufhellung tritt sehr rasch ein, schon nach 15 Minuten ist sie meist vollständig.

Nach Auftreten der Aufhellung vorgenommene Fällungen mit 20%iger Sulfosalicylsäure ergaben eine erheblich geringere Ausfällung als die Kontrolle. Jn späteren Stunden der Verdauung trat überhaupt keine Fällung mehr auf. Es konnte also schon die Aufhellung der Trübung als qualitatives Maß für die verdauende Wirkung des Trypsins benutzt werden.

Als erstes stellten wir für unsere Methode die wirksame Grenzkonzentration des Trypsins Merck fest. Sie lag bei 12 Stunden Beobachtungszeit im Brutschrank von 37° bei einer Konzentration des Trypsins von 1 : 64 000. und verschob sich auch bei weiterer Einwirkung über 24 Stunden hinaus nicht mehr (s. Tabelle 1).

Tabelle 1.

Serum in heißes Wasser gespritzt (10%ig) Amm.-Chlorid-Ammoniakpuffer pH 8,3 mol. 1/40

| Trypsin in aqu. dest. mit Zusatz von $CaCl_2$ (0,01%ig) | nach 12 Std. Brutschrank Trübung |
|---|---|
| 1 : 16 000 | — — — |
| 1 : 32 000 | — — — |
| 1 : 64 000 | — — + |
| 1 : 128 000 | + + + |
| 1 : 256 000 | + + + |
| 1 : 512 000 | + + + |
| 1 : 1 024 000 | + + + |
| Kontrolle — | + + + |

Eine in der gleichen Weise vorgenommene Untersuchung mit Zusatz von Enterokinase (Krause-Medico) ergab keine Verschiebung der Grenzkonzentration. Aus diesem Ergebnis ist zu schließen, daß Trypsin Merck schon maximal aktiviert ist.

## Feststellung des Einflusses der pH.

Benutzt wurde ein Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer. Dabei wählten wir folgende pH-Werte: 8.0, 8.58, 9.19, 9.5. Es zeigte sich, daß die optimale Wirkung schon bei pH 8.58 erreicht war. Es wurden aber die weiteren Versuche mit Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer pH 8.3 angesetzt, um eine Schädigung der Zellen durch die alkalische Reaktion als solche zu vermeiden.

## Beeinflussung der verdauenden Kraft des Trypsins durch Calcium, Rohrzucker.

Da es sich bei den Versuchen mit Einzelzellen zeigte, daß ein Calziumzusatz zur Trypsinlösung notwendig war, prüften wir den Einfluß von abgestuften Calciumkonzentrationen auf die tryptische Verdauung bei $Na_2HPO_4$ als Puffer.

Tabelle 2.

Blutk. in heiß. Wasser ausgefällt 1%ig; $Na_2HPO_4$ mol/120; Trypsin 2,5%.

| | Trübung | | | |
|---|---|---|---|---|
| $CaCl_2$ | zu Beginn | n. 15′ | n. 45′ | n. 2 Std. |
| 0,5% | + + + | + + + | + + + | + + − |
| 0,25% | + + + | + + + | + + + | + + − |
| 0,125% | + + + | + + − | + + − | + + − |
| 0,0625% | + + + | + + − | + − − | + + − |
| 0,0312% | + + + | + − − | + − − | − − − |
| 0,0156% | + + + | + − − | − − − | − − − |
| 0,0078% | + + + | + − − | − − − | − − − |
| 0,039% | + + + | + − − | − − − | − − − |
| Kontrolle 1 mit Trypsin — | + + + | + − − | − − − | − − − |
| Kontrolle 2 ohne „ — | + + + | + + + | + + + | + + + |

Wie die Tabelle zeigt, trat schon eine deutliche Hemmung der Verdauung bei 0,0625% $CaCl_2$ in der Lösung auf.

Diese hemmende Calciumwirkung trat bei einem Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer nicht auf (s. Tabelle 3).

## Tabelle 3.

Blutk. in heiß. Wasser ausgefällt 1%ig; Trypsin 2,5%; Amm.-Chlorid-Ammoniak-Puff. pH 8,3; mol/40.

| | | Trübung | | |
|---|---|---|---|---|
| $CaCl_2$ | zu Beginn | n. 15' | n. 45' | n. 2 Std. |
| 0,5% | + + + | + — — | + — — | — — — |
| 0,25% | + + + | + — — | — — — | — — — |
| 0,125% | + + + | — — — | — — — | — — — — |
| 0,0625% | + + + | — — — | — — — | — — — — |
| 0,0312% | + + + | — — — | — — — — | — — — — |
| 0,0156% | + + + | — — — | — — — — | — — — — |
| 0,0078% | + + + | — — — | — — — — | — — — — |
| 0,0039% | + + + | — — — | — — — — | — — — — |
| Kontrolle 1 mit Trypsin — | + + + | — — — — | — — — — | — — — — |
| Kontrolle 2 ohne „ — | + + + | + + + | + + + | + + — |

Eine Nachprüfung der pH bei Phosphatpufferzusatz ergab, daß diese durch den $CaCl_2$-Zusatz nach der sauren Seite verschoben wird, wodurch die Hemmung der Fermentwirkung erklärt wird.

Rohrzucker hatte bis zu einer Konzentration von 20% keinen hemmenden Einfluß auf die tryptische Verdauung bei Phosphatpuffer.

### Die antitryptische Wirkung des Serums.

Wurde natives Serum der Einwirkung des Trypsins ausgesetzt, so trat erst nach 6—8 Stunden eine Aenderung der Farbe von rötlichgelb in eine bräunliche Farbe und eine Abnahme der durch Sulfosalicylsäure ausfällbaren Menge ein.

Wir prüften die antitryptische Wirkung des Serums genauer dadurch, daß wir abgestufte Serumkonzentrationen der Eiweißtestlösung zusetzten. Ein Zusatz von 10% Serum zeigte noch eine deutliche Hemmung der Aufhellung (Tabelle 4).

## Tabelle 4.

Blutk. in heiß. Wasser ausgefällt 1%ig; Trypsin 2,5%; $Na_2HPO_4$-Puffer mol/120.

| | | Trübung | | |
|---|---|---|---|---|
| Serum | zu Beginn | n. 15' | n. 45' | n. 2 Std. |
| 10% | + + + | + + + | + + + | + + — |
| 5% | + + + | + — — | + — — | + — — |
| 2,5% | + + + | + — — | — — — | — — — |
| 1,25% | + + + | + — — | — — — | — — — |
| 0,625% | + + + | + — — | — — — | — — — |
| 0,312% | + + + | + — — | — — — | — — — |
| 0,156% | + + + | + — — | — — — | — — — |
| 0,078% | + + + | + — — | — — — | — — — |
| Kontrolle 1 mit Trypsin — | + + + | + — — | — — — | — — — |
| Kontrolle 2 ohne „ — | + + + | + + + | + + + | + + + |

Anhangsweise wurde die tryptische Wirkung auf Gelatine untersucht. 10%ige erstarrte Gelatine wurde von 1%iger Trypsinlösung nach 1 Stunde Brutschrank verflüssigt. Bei einer Trypsinverdünnung von 1 : 400 war die Konsistenz gallertig. Eine Verdünnung von 1 : 800 ließ keine Wirkung mehr erkennen (Tabelle 5).

Tabelle 5.

10%ige Gelatinelösung; $Na_2HPO_4$ mol/120

| Trypsin | nach 1 Stunde Brutschrank |
|---|---|
| 1 : 100 | flüssig |
| 1 : 200 | gallertig |
| 1 : 400 | gallertig |
| 1 : 800 | fest |
| 1 : 1 600 | fest |
| 1 : 3 200 | fest |
| 1 : 6 400 | fest |
| 1 : 12 800 | fest |
| 1 : 25 600 | fest |
| Kontrolle — | fest |

## II. Vorversuche über die Trypsinwirkung auf Organe.

### 1. Wirkung auf den isolierten Froschmuskel.

Die Verdauungsversuche wurden an dem sorgfältig abpräparierten Musc. gastrocnemius ausgeführt. Der Muskel wurde zusammen mit 10%igem Trypsin, einer Calciumbeigabe von der Endkonzentration von 0,01% und Ammoniak-Pufferlösung in den Brutschrank gebracht. Als Konservierungsmittel diente ein kleiner Thymolkristall.

Nach 2 Stunden war noch keine sichtbare Veränderung festzustellen.

Nach 4 Stunden zeigte sich jedoch an den oberflächlichen Schichten eine Ablösung von feinen Fasern.

Nach 8 Stunden war der Muskel in einzelne Teile aufgelöst.

Nach 24 Stunden war der Muskel bis auf kleine, vor allem sehnige Teile (Ansatzsehne des Musc. gastrocn.) aufgelöst.

In kleine Stücke zerschnittener Muskel wurde wesentlich rascher verdaut. Hier war das Gewebe schon nach 4 Stunden bis auf einige kleine,

sehnige Reste aufgelöst. Im mikroskopischen Präparat waren noch Teile von Muskelfasern zu erkennen.

Ein Muskel wurde 10 Minuten gekocht und dann in der Trypsin-Pufferlösung in den Brutschrank gegeben. Es ergab sich nach 4 Stunden eine etwas stärkere Auffaserung als beim nativen Muskel.
Nach 24 Stunden waren wie beim nativen Muskel nur noch Gewebstrümmer vorhanden.

Die folgende Tabelle über das Verhalten des Gewichts der Muskel zeigt, daß nach 4 Stunden von dem gekochten Muskel mehr verdaut war als vom nativen Es wurde der Muskel vor dem Versuch und, nachdem er 4 Stunden im Brutschrank der verdauenden Tätigkeit des Trypsins ausgesetzt war, gewogen.

Tabelle 6.

Der Muskel wurde in der üblichen Anordnung (10%iges Trypsin, 0,01%iges Calcium, Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer mol/40) 4 Stunden im Brutschrank gehalten.

| | Gewicht vor dem Versuch | Gewicht nach 4 Stdn. Brutschrank | Abnahme |
|---|---|---|---|
| Muskel nativ | 0,675 g | 0,521 g | 22 % |
| Muskel „ | 0,815 g | 0,639 g | 21,5 % |
| Muskel 10′ gekocht | 0,410 g | 0,246 g | 39 % |
| Muskel 10′ gekocht | 0,442 g | 0,246 g | 41 % |

Da beim Abpräparieren eines einzelnen Muskels, Kontinuitätstrennungen beim Ablösen an der Ansatzstelle nicht mit Sicherheit zu vermeiden sind und diese Verletzungen der Membran, wie aus der rascheren Verdauung des zerschnittenen Muskels hervorgeht, eine Rolle für die Angreifbarkeit spielen kann, stellten wir ein Präparat her, bei dem sich dieser Fehler vermeiden ließ, indem wir von einer ganzen Froschextremität die Haut abzogen und die Extremität dann in die Trypsinlösung hängten.

Auch hier ergab sich, daß wie beim isolierten Muskel nach 4 Stunden unter Ablösung von Membranteilen eine Auffaserung der oberflächlichen Schichten eintrat. Nach 20 Stunden war die betr. Extremität völlig skelettiert. An den Ansatzstellen der Muskeln waren noch einige Sehnenfasern sichtbar. Am Boden des Gefäßes fanden sich Muskel- und Bindegewebstrümmer.

In einem weiteren Versuch setzten wir die Extremität mitsamt der Haut der Trypsinwirkung aus.

Hier waren nach 4 Stunden die Schwimmhäute zum größten Teil aufgelöst. Auch die äußersten Schichten der Haut lösten sich in Fetzen ab. Sonst war am Aussehen der Haut (Farbe, Pigmentierung) keine Veränderung zu bemerken.

Nach 20 Stunden war jedoch die Extremität in derselben Weise skelettiert wie die abgezogene.

In beiden Fällen war die Kontrollextremität in mehreren Versuchen noch unversehrt. Es ließen sich auch keine Zeichen von Fäulnis feststellen.

2. Wirkung auf die Haut der weißen Maus.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wirkung des Trypsins auf das abgezogene Fell einer weißen Maus untersucht.

Wir gingen dabei folgendermaßen vor:

Einer getöteten weißen Maus wurde das Fell abgezogen. Daraus bildeten wir einen kleinen Sack, in den die übliche Trypsinlösung gegeben wurde. Es stellte sich jedoch heraus, daß nach einer Stunde die gesamte Lösung durch das Mausfell hindurchgesickert war, ohne natürlich in dieser kurzen Zeit eine Wirkung hinterlassen zu können. Wir zerlegten daher das Mäusefell in mehrere Stückchen und setzten sie teils in Trypsin, teils in physiologischer Kochsalzlösung in den Brutschrank. In verschiedenen Zeitabständen (3,5 und 8 Stunden) wurde ein Stückchen dem Brutschrank entnommen und mit dem dazugehörigen Kontrollstückchen verglichen. Dabei konnten wir folgendes beobachten:

Nach 3 Stunden ließen sich bei dem der Trypsinlösung ausgesetzten Stückchen die Haare vereinzelt mit dem Griff einer Pinzette abschieben.

Beim Kontrollstück war dies nicht möglich.

Nach 5 Stunden ließen sich die Haare zum größten Teil im Zusammenhang abschieben, einzelne, kleine Inseln blieben stehen.

Die Kontrolle war unverändert.

Nach 8 Stunden ließen sich die Haare in ihrer Gesamtheit glatt abschieben. In der Haut waren viele kleine Löcher zu bemerken, anscheinend an Stellen, wo Gefäße eintraten.

Kontrollstück unverändert.

## III. Die verdauende Wirkung des Trypsins auf Einzelzellen [rote Blutkörperchen].

Da die roten Blutkörperchen leicht zugängliche Objekte zur Untersuchung von Einzelzellen sind und außerdem die Zerstörung sehr leicht

an der auftretenden Hämolyse festgestellt werden kann, setzten wir Versuche mit Rinderblutkörperchen an. (Tabelle 7). Matthes [1]) hat zwar bereits gelegentlich von Versuchen über die Natur des Complements festgestellt, daß rote Blutkörperchen durch Trypsin nicht hämolysiert werden. Es schien uns aber trotzdem angebracht, die Verdaubarkeit von Blutkörperchen unter verschiedenen Bedingungen noch einmal zu untersuchen.

Ein Ansatz von 1%iger Trypsinlösung mit 1%iger Blutkörperchenaufschwemmung zeigte schon nach kurzer Zeit völlige Hämolyse. Diese hämolytische Wirkung zeigte jedoch auch eine Trypsinlösung, die vor dem Zusatz durch 10 Minuten langes Kochen inaktiviert worden war. Die Inaktivierung wurde in einem Kontrollversuch an unserer Eiweißtestlösung nachgewiesen.

Es konnte also diese Hämolyse nicht auf einer verdauenden Wirkung des Trypsins beruhen.

Dieser hämolytische Faktor des Trypsins konnte durch mehrmaliges Ausschütteln des Trypsinpulvers mit Aether, auch nach Ansäuern, nicht entfernt werden. Dagegen ließ sich die Hämolyse durch Zusatz von $CaCl_2$ vollständig verhindern. Es dürfte sich also doch um eine Seifenwirkung handeln. Zur Aufhebung genügte eine $CaCl_2$-Konzentration von 0,01%, die wir bei allen diesen Versuchen zugaben.

Wie bei dem Versuch mit einfacher Eiweißlösung ergab auch hier der Zusatz von Enterokinase keine Aenderung des Ergebnisses.

Tabelle 7.

| 1% ige Blutk. Aufschwemm. | Puffer | Trypsin | Calcium-chlorid | n. ½ St. Brutschrank | n. 4 St. Brutschrank | n. 6 St. Brutschrank |
|---|---|---|---|---|---|---|
| „ | mol/120 $Na_2HPO_3$ | 1%ig | — | o. B. | Hämolyse | Hämolyse |
| „ | „ | 1%ig 10 Min. gek. | — | o. B. | Hämolyse | Hämolyse |
| 1% Blutk. in heißes Wasser gespritzt | „ | 1%ig | — | Aufhellg. | Aufhellg. | Aufhellg. |
| „ | „ | 1%ig 10 Min. gek. | — | keine Veränderung | | |
| 1% Blutkörperch.-Aufschwemmung | Amm. chlor.-Ammoniakpuff. mol/40 | 1%ig | 0,01% | keine Hämolyse | | |
| „ | „ | Tryps. + 1%ig Enterokinase | 0,01% | keine Hämolyse | | |

[1]) Münchn. med. Woschr. 1902 I, S. 8.

Es wurde eine Reihe verschiedener Trypsinkonzentrationen zugesetzt, und zwar 10%ig, 5%ig, 2%ig, 1%ig. Bei keiner der geprüften Konzentrationen trat Hämolyse ein.

In einem weiteren Versuch wurde Trypsin, das schon 4 Stunden im Brutschrank auf eine Aufschwemmung roter Blutkörperchen eingewirkt hatte, ohne Hämolyse hervorzurufen, abgesaugt und mit der üblichen Eiweißtestlösung in den Brutschrank gegeben. Dabei trat schon nach 15 Minuten eine deutliche Aufhellung auf. Das Trypsin hatte also seine verdauende Kraft behalten.

Als nächstes wurde untersucht, ob sich eine typische Wirkung an einer Abnahme der Resistenz der Erythrocyten gegenüber Hypotonie feststellen ließe.

Wir setzten den Versuch folgendermaßen an: Einer Aufschwemmung von roten Blutkörperchen wurde Trypsin zugegeben, sodaß die Endkonzentration der Erythrocyten 10%ig, die des Trypsins 1%ig und 10%ig waren. Vor Vornahme der Resistenzprüfung wurde das überstehende Trypsin abgesaugt. Auch hier zeigte sich nach 4 Stunden Brutschrank keine Verschiebung der Resistenz, bei den mit 10%igem Trypsin versetzten Erythrocyten eher eine Zunahme derselben, die jedoch kaum auf die Trypsinwirkung zurückzuführen sein dürfte. (Tabelle 8).

Tabelle 8

| NaCl Lösg. | Trypsin 10% | Trypsin 1% | Kontr. 1 ohne Trypsin + Puffer | Kontr. 2 ohne Trypsin ohne Puffer |
|---|---|---|---|---|
| | | nach 4 Stunden Brutschrank | | |
| 0,9 % | | | | |
| 0,81 % | | | | |
| 0,72 % | | | | |
| 0,63 % | | | | |
| 0,54 % | | | | |
| 0,45 % | | + + | | + + + |
| 0,36 % | | + + + | + + + | + + + |
| 0,27 % | | + + + | + + + | + + + |
| 0,17 % | + + + | + + + | + + + | + + + |

+ + + = vollständige Hämolyse

In einer weiteren Versuchsreihe wurde geprüft, ob unterschwellige Konzentrationen von hämolytisch wirksamen Substanzen, Saponin und Toluol unter Trypsinwirkung zu hämolysieren vermögen. Dabei gingen wir folgendermaßen vor: 1. Es wurde eine abgestufte Verdünnungsreihe von Saponin hergestellt, die zusammen mit 10%igem Trypsin, Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer und $CaCl_2$ 0,01%ig einer Aufschwemmung roter Blutkörperchen (im Endeffekt 10%ig) zugegeben und in den Brutofen gebracht wurde. Nach 4 Stunden hatten wir folgendes Ergebnis (Tabelle 9): Die Vorbehandlung mit Trypsin war ohne Einfluß auf die Hämolysierbarkeit durch Saponin und Toluol.

Tabelle 9.

| | Rote Blutk. | Trypsin | Amm. chlorid | Calcium |
|---|---|---|---|---|
| | Aufschwemm. 10% | 10%ig | Ammoniak-Puffer mol/40 | 0,01% |
| | Nach 4 Stunden Brutschrank | | | |
| | I. | II. | III. | |
| Saponin | m. Trypsin | o. Trypsin | o. Trypsin, o. Puffer | |
| 1 : 2 000 | + + + | + + + | + + + | |
| 1 : 4 000 | + + + | + + + | + + + | |
| 1 : 8 000 | + + + | + + + | + + + | |
| 1 : 16 000 | + + + | + + + | + + + | |
| 1 : 32 000 | + + + | + + + | + + + | |
| 1 : 64 000 | — — — | + | — — — | |
| 1 ; 128 000 | — — — | (+) | — — — | |
| 1 : 256 000 | — — — | (+) | — — — | |

Weiterhin stellten wir im Scheidetrichter eine toluolgesättigte Lösung (in 0,9%igem NaCl) her. Von dieser toluolgesättigten NaCl-Lösung wurde eine abgestufte Verdünnungsreihe hergestellt, die zusammen mit der üblichen 10%igen Blutkörperchenaufschwemmung, 10%igem Trypsin, 0,01%igem Calciumchlorid, Ammoniumchlorid-Ammoniakpuffer in den Brutofen gegeben wurde. Nach 4 Stunden war keinerlei Hämolyse feststellbar (Tabelle 10).

Tabelle 10.

| Verdünnung der Toluolgesättigten physiol. NaCl-Lösung | Rote Blutkörp. Aufschwemmung 10%ig I. m. Trypsin | Amm. chlor. Amm. Puffer mol/40 Nach 4 Stunden Brutschrank II. o. Trypsin | $CaCl_2$ 0,01% III. o. Trypsin o. Puffer |
|---|---|---|---|
| 1 : 2 | | keine Hämolyse | |
| 1 : 4 | | keine Hämolyse | |
| 1 : 8 | | keine Hämolyse | |
| 1 : 16 | | keine Hämolyse | |
| 1 : 32 | | keine Hämolyse | |

In einem weiteren Versuch fällten wir eine 10%ige Aufschwemmung roter Blutkörperchen mit 50%igem Alkohol aus. Der Alkohol wurde durch mehrmaliges Zentrifugieren wieder ausgewaschen und die so ausgefällten Blutkörperchen mit einer 10%igen Trypsinlösung und den üblichen Zusätzen in den Brutschrank gegeben. Nach 2 Stunden zeigte sich eine geringe, nach 4 Stunden eine deutliche Aufhellung gegenüber der Kontrolle.

Es zeigt sich also, daß gefälltes Hämoglobin ohne weiteres verdaut wird. Dies geht auch aus den Versuchen hervor, bei denen wir als Eiweißtestlösung hämolysiertes Blut, das in heißes Wasser gespritzt war, benützt hatten.

## Zusammenfassung.

Im Gegensatz zu allen untersuchten Gewebsteilen, die durch Trypsin eine rasche Auflösung erfahren, erwiesen sich rote Blutkörperchen vollkommen resistent gegenüber der tryptischen Einwirkung. Auch bei Resistenzprüfung mit Hypotonie und Saponin war keine Veränderung der Resistenz durch die tryptische Vorbehandlung zu bemerken. Gefälltes Hämoglobin wird jedoch ohne weiteres durch Trypsin aufgelöst.

Die Ursache dieser Resistenz liegt offenbar in der Membran der roten Blutkörperchen; doch ließen sich die näheren Umstände nicht aufklären.

# Lebenslauf.

Geboren wurde ich, Eberhard Knauer, am 14. 2. 1911 in Maisenbach OA. Neuenbürg, als Sohn des damaligen Schullehrers und jetzigen Oberstudiendirektors in Freudenstadt, Paul Knauer und seiner Gattin Johanna, geb. Talmon-Gros. Nach dem Besuch der Volksschule in Dettingen/Erms, Tübingen, Künzelsau, der Lateinschule in Ingelfingen, des Gymnasiums in Tübingen und Heilbronn legte ich dort im Frühjahr 1931 die Reifeprüfung ab. Ich studierte in Tübingen Medizin bis zum Physikum im Sommer 1933. Die ersten klinischen Semester studierte ich in Berlin bezw. Kiel. Im Herbst 1934 meldete ich mich zum freiwilligen 1-jähr. Dienst in der damaligen Reichswehr und diente bis zum Ablauf der Dienstverpflichtung bei der ersten F. A. Landsberg. Die letzten klinischen Semester verbrachte ich in Tübingen, wo ich im Herbst 1937 mein Staatsexamen bestand. Zuletzt war ich 5 Monate als Medizinalpraktikant im Städtischen Krankenhaus in Swinemünde tätig.